



TRANSFORMASI GENETIK *InMYB1-CCD4a* PADA TANAMAN *Tagetes erecta* MELALUI PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*

ELISA APRILIANI



**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Transformasi Genetik *InMYB1-CCD4a* pada Tanaman *Tagetes erecta* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2022

Elisa Apriliani
NIM A253190051

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





RINGKASAN

ELISA APRILIANI. Transformasi Genetik *InMYB1-CCD4a* pada Tanaman *Tagetes erecta* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Dibimbing oleh DEWI SUKMA, SUDARSONO, dan MUHAMAD SYUKUR.

Marigold (*Tagetes erecta*) merupakan komoditas florikultura yang memiliki banyak manfaat terutama sebagai tanaman hias, bunga potong dan bahan baku industri. Daya tarik tanaman *Tagetes* dinilai dari sisi keindahan warna bunga yang beragam, oleh karena itu, pemuliaan tanaman pada *Tagetes* dalam peningkatan variasi warna bunga masih terus dikembangkan. Salah satu metode alternatif dalam pemuliaan tanaman pada spesies *Tagetes erecta* adalah melalui pendekatan bioteknologi secara rekayasa genetik. Rekayasa genetik dilakukan dengan mengintegrasikan *InMYB1-CCD4a* ke dalam genom tanaman yang bertujuan mengurangi pigmentasi oranye pada bunga dengan mendegradasi senyawa karotenoid secara spesifik pada mahkota bunga. Degradasi karotenoid pada bagian spesifik, diharapkan tidak mengubah sifat lain dari spesies *Tagetes erecta*. Umumnya, pelaksanaan transformasi genetik bergantung pada serangkaian kegiatan kultur jaringan dalam regenerasi tanaman transgenik. Hambatan dalam regenerasi tanaman transgenik adalah metode dan komposisi media regenerasi yang tidak sesuai dengan pertumbuhan sel, oleh sebab itu, informasi terkait rangkaian tahapan kultur jaringan dalam meningkatkan efisiensi transformasi dalam regenerasi tanaman transgenik menjadi langkah awal dalam pelaksanaan rekayasa genetik. Metode transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens* secara *in planta* merupakan salah satu alternatif yang dapat meminimalisir kegiatan regenerasi sel transgenik secara *in vitro*. Regenerasi sel transgenik meristematik terjadi lebih cepat secara *in vivo*. Transformasi *in planta* pada spesies *T. erecta* belum banyak dikembangkan. Pada penelitian ini dilakukan studi terkait metode transformasi genetik *InMYB1-CCD4a* melalui perantara *A. tumefaciens* secara *in vitro* maupun *in planta* pada spesies *T. erecta* pada beberapa jenis eksplan.

Penelitian ini terdiri dari dua percobaan yang bertujuan untuk (1) memperoleh informasi metode regenerasi tanaman *T. erecta* terkait sumber eksplan dan komposisi media regenerasi; (2) memperoleh informasi terkait metode transformasi genetik yang efisien melalui *A. tumefaciens* EHA105; dan (3) memperoleh tanaman transgenik yang terintegrasi gen *InMYB1-CCD4a*.

Percobaan pertama adalah induksi organogenesis dan regenerasi tunas pada spesies *T. erecta* secara *in vitro*. Percobaan dilakukan dari bulan Agustus hingga November 2021 di Laboratorium kultur jaringan-1, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Sumber eksplan yang digunakan adalah daun dan ruas batang planlet *in vitro*. Hasil percobaan menunjukkan eksplan daun lebih responsif dan potensial dalam pembentukan tunas dibandingkan penggunaan eksplan ruas batang pada media dasar MS dengan kombinasi IAA dan BAP. Modifikasi konsentrasi IAA terhadap BAP pada media induksi organogenesis mampu meningkatkan persentase pertumbuhan dan jumlah tunas pada eksplan daun. Media induksi dengan 2,8 μM IAA + 13,3 μM BAP menunjukkan 63% eksplan membentuk tunas dengan tiga hingga empat tunas per eksplan dalam 28 hari inkubasi. Hasil percobaan ini memberi informasi terkait jenis eksplan dan komposisi media yang optimal dalam regenerasi sel transgenik.

Percobaan kedua adalah transformasi konstruk *InMYBI-CCD4a* pada spesies *T. erecta* melalui perantara *A. tumefaciens*. Percobaan dilakukan pada Desember 2021 hingga Juni 2022 di Laboratorium Kultur jaringan-1, dan Laboratorium *Plant Molecular Biology*-1 Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB. Eksplan yang digunakan pada percobaan ini adalah daun dan benih *T. erecta*. Metode transformasi genetik melalui bakteri *A. tumefaciens* EHA105 membawa gen *InMYBI-CCD4a* pada eksplan daun secara *in vitro* menunjukkan efisiensi transformasi senilai 7,0% dan efisiensi regenerasi tunas putatif transforman 0,4%. Pada percobaan transformasi benih secara *in vitro*, menunjukkan efisiensi transformasi senilai 24,1% dan memperoleh 14 kandidat tanaman transgenik T₀ yang terintegrasi gen *InMYBI-CCD4a* melalui analisis molekuler. Hasil percobaan transformasi *in planta* pada benih *in vivo* menunjukkan efisiensi transformasi senilai 2,3% dan memperoleh 1 kandidat tanaman transgenik T₀ bersifat kimera membawa gen *InMYBI-CCD4a* berdasarkan analisis molekuler berbasis PCR.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, *in planta*, *InMYBI-CCD4a*, *in vitro*, transformasi genetik.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





SUMMARY

ELISA APRILIANI. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Genetic Transformation of *InMYB1-CCD4a* in *Tagetes erecta*. Supervised by DEWI SUKMA, SUDARSONO, and MUHAMAD SYUKUR.

Marigold (*Tagetes erecta*) is a floriculture plant with many benefits, especially for ornamental plants, cut flowers, and industrial uses. *Tagetes* is known to have beautiful and various flower colours for their attractiveness. Therefore, plant breeding on *Tagetes* to increase the diversity of flower colour is still being developed. Genetic engineering by integrating *InMYB1-CCD4a* into the *T. erecta* genome is one of the breeding methods. This method aims to reduce orange pigment by degrading carotenoid compounds, expressed explicitly in *T. erecta* flower petals. Generally, the implementation of genetic engineering depends on the regeneration of the transgenic process. Unsuitable methods and media composition were the main obstacles to regenerating transgenic plants *in vitro*. Therefore, the information related to tissue culture activities to increase the efficiency of transformation in regenerated transgenic plants is the first step in using the genetic engineering approach. The *in planta* genetic transformation method through *Agrobacterium tumefaciens* is one of the alternatives that can minimize *in vitro* activities. Meristematic transgenic cell regeneration occurs more rapidly in *ex vitro*. *In planta method* in *T. erecta* species had not been developed. In this study, we conducted the genetic transformation method by integrating *InMYB1-CCD4a* through *A. tumefaciens in vitro* and *in planta* in several types of *T. erecta* explants. This study consisted of two experiments, which aimed to obtain: information on the regeneration method for *T. erecta* based on the explant source and regeneration medium composition, information about genetic transformation methods efficiency through *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, and transgenic plants that integrated the *InMYB1-CCD4a* gene.

The first experiment was *in vitro* organogenesis and shoot regeneration induction in *T. erecta*. The experiment was conducted from August to November 2021 at the Tissue Culture Laboratory 1, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, IPB University. The explant sources used were leaves and internode. This study showed leaf explants were more responsive and potential than stem internode explants for shoot formation. Modifying IAA concentration on the BAP medium for organogenesis induction increased the percentage of growth and number of shoots in leaf explant. Induction medium with 2,8 μM IAA + 13,3 μM BAP showed that 63% of explants formed shoots, with three to four shoots per explant formed within 28 days of incubation. These results provide information regarding the type of explant and the optimal composition of the media to be further used in regenerating transgenic cells.

The second experiment was the *A. tumefaciens*-mediated transformation of the *InMYB1-CCD4a* construct in *T. erecta* species. The experiments were conducted from December 2021 to June 2022 at the Tissue Culture Laboratory 1 and Plant Molecular Biology Laboratory 1, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, IPB University. The explants used in this experiment were leaves and seeds of *T. erecta*. The *in vitro A. tumefaciens*-mediated genetic transformation with EHA105 bacteria carrying the *InMYB1-*

@Hak Cipta dan Hak Kekayaan Intelektual IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

CCD4a gene was conducted in leaf explants and seeds. The leaf explant experiment showed transformation, and putative shoot transformant regeneration efficiency was 7,0% and 0,4%, respectively. On the other hand, *in vitro* seed transformation experiment showed 24,1% transformation efficiency and obtained 14 T₀ transformants that integrated the *InMYB1-CCD4a* gene through molecular analysis. Meanwhile, *in planta* seed methods showed 2,3% transformation efficiency, which received one chimeric T₀ transformant carrying the *InMYB1-CCD4a* gene through PCR-based molecular analysis.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, *in planta*, *InMYB1-CCD4a*, *in vitro*.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

IPB University

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



TRANSFORMASI GENETIK *InMYB1-CCD4a* PADA TANAMAN *Tagetes erecta* MELALUI PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*

ELISA APRILIANI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains
pada
Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi
Tanaman

**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Tim Penguji pada Ujian Tesis:

1. Prof. Dr. Ir. Dewa Ngurah Suprpta., M.Sc.
2. Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu E.K., M.S.



IPB University

Bogor Indonesia

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



Judul Tesis : Transformasi Genetik *InMYB1-CCD4a* pada Tanaman *Tagetes erecta* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*

Nama : Elisa Apriliani

NIM : A253190051

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si.



Pembimbing 2:

Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc.



Pembimbing 3:

Prof. Dr. Muhamad Syukur, S.P., M.Si.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu E.K., M.S.

NIP 196311071988112001



Plt. Dekan Fakultas Pertanian:

Prof. Dr. Ir. Suryo Wiyono, M.Sc.Agr.

NIP 196902121992031003



Tanggal Ujian:
11 Agustus 2022

Tanggal Lulus:

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia- Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Agustus 2021 sampai bulan Juni 2022 ini adalah pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetik, dengan judul “Transformasi Genetik *InMYB1-CCD4a* pada Tanaman *Tagetes erecta* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*”. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini banyak pihak yang turut terlibat. Oleh karena itu, izinkan penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si., Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc., dan Prof. Dr. Muhamad Syukur, S.P., M.Si selaku komisi pembimbing yang telah membimbing dan banyak memberi saran dalam proses perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. Ir. Dewa Ngurah Suprpta, M.Sc. sebagai penguji luar komisi pada ujian tesis yang telah memberi saran dalam penyusunan tesis ini.
3. Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu E.K., M.S. selaku Ketua Program Studi Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman yang telah memberi banyak arahan dan bimbingan selama perkuliahan.
4. Dosen di lingkungan Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman yang telah memberi banyak ilmu sebagai pondasi dalam penyusunan tesis ini.
5. Sekretariat Program Pascasarjana Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB yang telah membantu dalam proses administrasi selama perkuliahan.
6. Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan Provinsi Bali atas program kerja sama untuk penelitian dan pengembangan varietas marigold.
7. Prof. Ming-Tsair Chan, Academia Sinica-Biotechnology Center in Southern Taiwan (AS-BCST) yang membantu dalam konstruksi gen yang digunakan pada penelitian.
8. Staf Laboratorium Departemen AGH IPB, serta rekan-rekan Laboratorium Kultur Jaringan-1 dan Laboratorium Plant molecular and Biology-1 (PMB1) yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.
9. Rekan-rekan mahasiswa/i Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman yang telah banyak membantu dalam proses perkuliahan.
10. Keluarga tercinta, terkhusus ayah Dr. Ir. H. Syafruddin Nasution, M.Sc., dan ibu Ir. Nuraini., M.S serta kakak dan abang yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayang, sehingga penulis mampu menyelesaikan pendidikan magister ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2022

Elisa Apriliani

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.3 Hipotesis	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	3
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Marigold (<i>Tagetes erecta</i>)	5
2.2 Transformasi Genetik Melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3 Transformasi <i>In planta</i>	8
2.4 Genetik <i>InMYBI-CCD4a</i>	8
III INDUKSI ORGANOGENESIS DAN REGENERASI TUNAS PADA SPESIES <i>Tagetes erecta</i> SECARA <i>IN VITRO</i>	10
3.1 Abstrak	10
3.2 Pendahuluan	11
3.3 Metode	11
3.4 Hasil dan Pembahasan	13
3.5 Simpulan	17
IV IDENTIFIKAS TRANSFORMASI KONSTRUK <i>InMYBI-CCD4a</i> PADA SPESIES <i>Tagetes erecta</i> MELALUI PERANTARA <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	18
4.1 Abstrak	18
4.2 Pendahuluan	18
4.3 Metode	19
4.4 Hasil dan Pembahasan	23
4.5 Simpulan	30
VI PEMBAHASAN UMUM	31
VII SIMPULAN DAN SARAN	34
7.1 Simpulan	34
7.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	42
RIWAYAT HIDUP	47



DAFTAR TABEL

3.1	Pengaruh IAA dan BAP pada organogenesis ruas dan daun <i>T. erecta</i>	14
3.2	Faktor tunggal IAA dan BAP pada organogenesis daun <i>T. erecta</i>	15
3.3	Interaksi IAA dan BAP terhadap tunas dan akar pada daun <i>T. erecta</i>	16
4.1	Sekuen primer spesifik gen <i>InMYB1-CCD4a</i>	20
4.2	Persentase eksplan mati pada media seleksi higromisin	24
4.3	Transformasi genetik pada daun <i>T. erecta</i> melalui <i>A. tumefaciens</i>	26
4.4	Transformasi genetik pada benih <i>T. erecta</i> melalui <i>A. tumefaciens</i>	28

DAFTAR GAMBAR

1.1	Diagram alir penelitian	4
2.1	Variasi warna bunga <i>Tagetes erecta</i>	5
2.2	Ilustrasi transformasi T-DNA pada infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3	Daerah T-DNA yang membawa gen <i>InMYB1-CCD4a</i>	9
3.1	Respon eksplan pada media induksi 5,7 μ M IAA + 13,3 μ M BAP	14
3.2	Respon eksplan daun pada media induksi organogenesis	16
4.1	Elektroforegram gen <i>InMYB1-CCD4a</i> melalui PCR koloni	21
4.2	Respon eksplan 28 mst pada taraf konsentrasi higromisin berbeda	24
4.3	Respon sel transgenik pada media seleksi	25
4.4	Respon eksplan transformasi genetik	26
4.5	Eksplan transformasi benih	27
4.6	Respon kecambah pada media seleksi	28
4.7	Transformasi <i>in planta</i> pada benih	29
4.8	Elektroforegram gen <i>InMYB1-CCD4a</i> berbasis PCR	30

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media kultur jaringan	43
2	Media pertumbuhan bakteri	44
3	Isolasi DNA	45
4	Kandungan pupuk AB Mix	46